

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1938-1939 — N° 109

LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SANG

NOUVELLE METHODE DE MESURE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Lundi 10 Juillet 1939

PAR

Franck, François GEORGET

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux (Ph.)

Né le 3, Juillet 1909, à Pons (Charente-Inférieure)

Examineurs de la Thèse

MM. JEANNENEY, professeur, *Président*
LABAT, professeur
DE GRAILLY, agrégé
BROUSTET, agrégé

Juges

BORDEAUX
IMPRIMERIE J. PECHADE

20, Rue Margaux, 20

1939



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1938-1939 — N° 109

LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SANG

NOUVELLE METHODE DE MESURE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Lundi 10 Juillet 1939

PAR

Franck, François GEORGET

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux (Ph.)

Né le 3 Juillet 1909, à Pons (Charente-Inférieure)

Examineurs de la Thèse	{	MM. JEANNENEY, professeur, <i>Président</i>	{	<i>Juges</i>
		LABAT, professeur		
		DE GRAILLY, agrégé		
		BROUSTET, agrégé		

BORDEAUX
IMPRIMERIE J. PECHADE

20, Rue Margaux, 20

1939

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC

ASSESEUR : M. LABAT

DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. POUSSON, MOURE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE, CASSAËT,
CHAVANNAZ, C. SIGALAS, SABRAZÈS, BÉGOUIN, DUPOUY.

PROFESSEURS :

MM.

Clinique médicale.	MAURIAC.
id.	DUPÉRIÉ.
Clinique chirurgicale et gynécologique.	GUYOT.
Clinique chirurgicale.	PAPIN.
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.
Clinique d'Accouchements	ANDERODIAS.
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DAMADE.
Anatomie	VILLEMIN.
Anatomie générale et histologie.	G. DUBREUIL.
Hygiène.	LEURET.
Médecine légale et déontologie	LANDE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médicale.	RÉCHOU.
Chimie	CHELLE.
Botanique et matière médicale.	GOLSE.
Pharmacie	VITTE.
Physiologie	FABRE.

MM.

Zoologie et parasitologie	MANDOUL.
Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES.
Clinique chirurg. infantile et orthopédie	ROCHER.
Clinique méd. des maladies des enfants	CRUCHET.
Chimie biologique et médicale	MACHEBEUF.
Physique médicale et pharmaceutique.	WANGERMEZ.
Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques	BONNIN.
Clinique des malad. cutanées et syphilitiques.	PETGES.
Clinique des maladies des voies urinaires.	DUVERGEY.
Clinique des malad. nerveuses et mentales	ABADIE.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.	CREYX.
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.

Anatomie	DUFOUR.
Physiologie	N.
Médecine générale	PIÉCHAUD.
id.	DELMAS-MARSALET.
id.	DE GRAILLY.
id.	FONTAN.
id.	BROUSTET.
id.	DERVILLE.
id.	N.
Chirurgie générale	CHARRIER.

MM.

Chirurgie générale	LOUBAT.
id.	MASSE.
id.	DARGET.
id.	N.
Obstétrique	RIVIÈRE.
Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
Physique médicale	N.
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie.	N.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.

Médecine opératoire	JEANNENEY.
Accouchements	RIVIÈRE.
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.
Puericulture.	FAUGÈRE.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.
Médecine légale	DERVILLE.
Urologie	DARGET.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.

MM.

Ophtalmologie	CABANES (en congé)
Physique médicale et pharmaceutique	AURIAC.
Anatomie	J. BEAUVIEUX.
Chimie minérale.	CASTAGNOU.
Botanique	GIRARD.
Pharmacie galénique	MESNARD.
Bactériologie.	MOUREAU.
Physiologie	PETITEAU.

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. . .

N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

AUX MIENS

A MES AMIS

A MES MAITRES

DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

ET DES HOPITAUX DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE DOCTEUR CASTANET

A MONSIEUR LE DOCTEUR CATOR

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

PHARMACIEN

ANCIEN CHEF DE LABORATOIRE A L'HOPITAL SAINT-LOUIS

ANCIEN ÉLÈVE DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

Leurs conseils et leur enthousiasme
nous ont dirigé et soutenu au cours de
ces recherches, dont plusieurs sont
autant leur fait que le mien.

A MONSIEUR LE DOCTEUR MANDILLON

DOCTEUR ÈS-SCIENCES

MÉDECIN CAPITAINE DES TROUPES MÉTROPOLITAINES

ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX DE BORDEAUX

ASSISTANT DE CHIRURGIE DES HOPITAUX MILITAIRES

Qu'il veuille bien trouver ici l'ex-
pression de mon amitié et de ma
reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ BROUSTET
MÉDECIN DES HÔPITAUX

En témoignage de reconnaissance et
de respectueuse amitié.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ DE GRAILLY
MÉDECIN DES HÔPITAUX
CHEF DES TRAVAUX D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LABAT

PROFESSEUR DE TOXICOLOGIE ET HYGIÈNE APPLIQUÉE

PHARMACIEN-CHEF DES HOPITAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Nous lui exprimons toute notre gratitude pour l'exacte bienveillance qu'il nous a toujours manifestée et les précieux conseils qu'il ne nous a jamais refusés.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR JEANNENEY
CHIRURGIEN DES HOPITAUX
CHIRURGIEN-ADJOINT DU CENTRE RÉGIONAL CONTRE LE CANCER
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE CHIRURGIE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Dont les travaux ont inspiré cette thèse, et qui a bien voulu nous accepter dans son laboratoire, afin de nous faire collaborer à ses élégantes recherches sur l'immunologie.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse et reconnaissante admiration.

POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SANG

NOUVELLE MÉTHODE DE MESURE

INTRODUCTION

M. le Professeur JEANNENEY et MM. CASTANET et CATOR ont montré que, parmi les méthodes de laboratoire qui se proposent d'étudier les réactions de l'organisme en face d'une infection, le pouvoir hémo-bactéricide permettait d'apprécier dans leur ensemble les divers moyens de défense du tissu sanguin. Le pouvoir antitryptique du sang figure au nombre de ces moyens et semble y occuper une place intéressante.

On appelle « pouvoir antitryptique » la qualité que possède le sang normal d'inhiber l'action digestive de la trypsine sur les protides. Le pouvoir antitryptique s'oppose donc, dans une certaine mesure, aux ferments d'attaque protéolytiques des microbes, au cours des infections.

WRIGHT montra l'importance de cette mesure durant les maladies infectieuses. Il l'étudia en particulier parallèlement à la réserve alcaline, dans les infections par anaérobies. C'est dans le but d'appuyer et de compléter les données du pouvoir hémobactéricide que M. le Professeur JEANNENEY nous a conseillé de procéder à des mesures du pouvoir antitryptique.

Mais, par ailleurs, de nombreux auteurs ont étudié cette propriété du sang et ont signalé des variations durant la grossesse, les plaies et brûlures, la tuberculose, le cancer, certains troubles hépatiques, etc... Nous avons été étonné des résultats discordants publiés dans ces travaux, et qu'une méthode donnée comme intéressante par tant de

chercheurs, ne soit pas d'usage courant dans la pratique de laboratoire.

Nous croyons avoir trouvé une réponse à ces anomalies dans l'article que M. AGASSE-LAFONT consacre à la mesure du pouvoir antitryptique du sérum dans « *les Applications Pratiques du Laboratoire à la Clinique* ». Nous citons les passages les plus caractéristiques :

« Cette méthode a suscité déjà un nombre très considérable de travaux, depuis plusieurs années. Aussi, pourrait-on s'étonner que sa valeur ne soit pas encore exactement déterminée et surtout que de nombreuses contradictions existent dans les renseignements donnés par les différents auteurs à son sujet.

» En réalité, cette incertitude s'explique par la difficulté que l'on rencontre à mesurer avec précision le pouvoir antitryptique d'un sérum. D'une part, en effet, les méthodes de mesure proposées et utilisées sont fort nombreuses, et les résultats notés de façon différente : néanmoins, les variations devraient toujours se produire dans le même sens.

» Mais nous avons constaté d'autre part que, même avec une seule technique, la moindre cause peut faire varier le résultat. Il arrive aussi que la qualité défectueuse de la trypsine utilisée diminue ou supprime la valeur de la réaction.

» Pour toutes ces raisons, il serait à souhaiter que toute recherche sur ce sujet soit faite avec une rigueur extrême, et précédée d'un grand nombre d'expériences comparatives, pour juger de la valeur de la technique et des réactifs que l'on emploie. »

Nous nous proposons donc, après un résumé des méthodes déjà utilisées :

1° de décrire la méthode que nous avons mise au point (chapitres I, II et III);

2° de donner les résultats que nous avons obtenus, tant avec des sujets normaux qu'avec certains infectés (chapitre IV).

HISTORIQUE DES MÉTHODES

OPIE, en 1905, étudie l'autolyse des exsudats. Il injecte dans la cavité pleurale d'un chien un corps pulvérulent, de la farine par exemple (aleurone). L'exsudat qui se forme est recueilli par ponction aseptique et divisé en deux parts.

La première est traitée par la chaleur et le sulfate de magnésie. Le coagulum obtenu est kjeldahlisé. Le chiffre d'azote trouvé servira de témoin.

La deuxième part est abandonnée à elle-même, pendant un temps déterminé, avec ou sans antiseptique, à l'étuve, à la glacière, ou à la température ordinaire.

Puis, les protides sont coagulés et kjeldahlisés. La quantité d'azote trouvée permet d'étudier l'autolyse qui s'est produite.

OPIE remarque que du sérum sanguin, ajouté à la seconde partie de l'exsudat, retarde considérablement l'autolyse, et voit dans cette expérience un moyen de doser l'action antitryptique du sang.

GOLLA, en 1909, décrit minutieusement une méthode de mesure, inspirée en partie des travaux de Victor HENRI et de BAYLISS. Il prépare une solution de caséinate de soude, en milieu ammoniacal, et mesure sa résistivité. Puis il y ajoute une solution de trypsine et de 5 m. en 5 m. mesure la résistivité du système. Celle-ci varie, et l'auteur établit une courbe.

Enfin, dans un second essai, il mélange caséinate, trypsine et sérum, et établit une nouvelle courbe.

La comparaison des deux courbes permet d'apprécier l'action « empêchante » du sang.

Ces méthodes ne peuvent être retenues, en raison de leurs conditions techniques et de la difficulté de l'interprétation des résultats.

Actuellement, les traités techniques décrivent des pro-

cédés dérivés des travaux de MULLER et JOCHMANN, ASCOLI et BEZZOLA, Ch. ROUX et SAVIGNAC, etc.

1° D'une part, on prépare des plaques de gélatine solidifiée, coulée dans des boîtes de PÉTRI.

2° D'autre part, dans une série de tubes à hémolyse, on mélange, dans le premier : une goutte de sérum et une goutte de solution de trypsine ; dans le second : une goutte de sérum et deux gouttes de trypsine ; dans le troisième : une goutte de sérum et trois gouttes de trypsine, etc.

3° On porte avec une anse de platine une goutte de chaque dilution sur la plaque de gélatine.

Là où la trypsine était pure, apparaît un godet de digestion.

Là où le sang a neutralisé la trypsine, il ne se produit rien.

On note la dilution, une goutte de sérum pour quatre gouttes de solution de trypsine par exemple, pour laquelle le godet n'apparaît plus, et on dit que le pouvoir anti-tryptique est de $1/4$.

On peut remplacer la gélatine par une plaque de gélose au lait. La digestion tryptique se traduit alors par un disque clair sur fond sombre.

Cette technique, bien que simple en apparence, est assez décevante, et les résultats obtenus sont soumis à d'innombrables causes d'erreur.

Nous n'insisterons pas sur l'importance du degré d'humidité de la plaque, de la grosseur de la goutte, etc. Ce sont des conditions matérielles qu'il est assez facile au praticien de régler.

Malgré toutes les précautions prises, les résultats sont souvent irréguliers. Nous avons pensé que les réactifs employés en étaient responsables. En effet, il existe de grandes différences entre deux gélatines ou deux trypsines, trouvées dans le commerce, à tel point que les résultats ne sont plus comparables entre eux.

Nous avons essayé de tenir compte de cette notion dans l'étude de notre technique.

MÉTHODE PROPOSÉE

Principe.

Le Codex français de 1937 indique, à l'article « Pan-créatine », un « essai de l'action protéolytique » dont nous nous sommes inspiré. Nous avons été amené à formuler les propositions suivantes :

1° La trypsine, mise au contact de fibrine de porc, la digère et provoque la formation d'acides aminés. Les acides aminés peuvent être dosés par la méthode de SÖRENSEN, au formol. Leur quantité permet de caractériser l'activité de la trypsine.

2° Si l'on refait l'expérience en présence de sang, et si le sang « gêne » la trypsine, les acides aminés seront moins abondants. La différence mesurera le *Pouvoir anti-tryptique du sang*.

Pour vérifier ces propositions, nous avons procédé à trois recherches différentes :

- 1° étude des réactifs employés (ferment, albumine);
 - 2° conditions de l'activité protéolytique de la trypsine;
 - 3° étude du pouvoir « empêchant » du sang.
-

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES RÉACTIFS EMPLOYÉS

Nous avons examiné les réactifs proposés dans les différentes méthodes. Nous décrirons plus loin la technique de mesure que nous employons. Nous nous contenterons de dire ici que l'activité fermentaire se traduit en centimètres cubes de soude 0,1 N. Nous employons une burette de 2 cm³, graduée au centième.

TRYPSINE

Tous nos essais ont été faits avec de la trypsine BYLA. Nous utilisons :

a) *la trypsine pure*, en poudre sèche;

b) *la trypsine diluée au centième dans du lactose*, ce qui permet des prises d'essai aisées, correspondant à 1 mg. et moins de trypsine. La présence de lactose ne gêne pas la réaction. Cette dilution est remarquablement stable. En étudiant l'activité de 0,50 gr. de dilution, correspondant à 5 mg. de trypsine pure, nous avons trouvé :

le 10 Octobre 1938		0.78 cm ³
11 — —		0.79 —
17 — —		0.77 —
27 — —		0.80 —
30 — —		0.80 —
15 Novembre 1938		0.79 —
15 Janvier 1939		0.80 —
20 Février —		0.72 —
12 Mars —		0.78 —
1 Mai —		0.79 —
2 Juin —		0.78 —

c) *Une solution de trypsine.* — Les auteurs conseillent l'emploi d'une solution récente de trypsine (extemporanée, si possible) à 1 p. 100. La trypsine que nous avons employée se dissout très mal, et la préparation, utilisée aussitôt et *filtrée*, présente une activité à peu près nulle; elle donne, employée *telle quelle*, des résultats variant du simple au double, selon la quantité de précipité prélevée.

Certains conseillent une solution en milieu carbonaté à 2 p. 100. Nous avons eu les mêmes variations, et le carbonate gêne le dosage final.

Après divers essais, nous utilisons actuellement la préparation suivante :

trypsine en poudre	1,50 gr.
cyanure de mercure	0,05 —
eau distillée	100 cm ³

Laisser en contact 24 h., en agitant de temps en temps. Filtrer. On obtient un liquide clair.

Cette solution se conserve au moins deux mois. Le titre augmente pendant 8 jours environ après la filtration, puis se stabilise autour de 5 mg. de trypsine active par cm³.

Le cyanure de mercure est nécessaire pour assurer la conservation de la solution. Nous ne nous sommes pas préoccupé de savoir s'il gênait l'action de la trypsine, puisque nous ne cherchons pas à savoir quelle quantité de trypsine est dissoute dans l'eau, mais simplement à quelle quantité de trypsine active correspond 1 cm³ de la solution.

Nous employons une solution de trypsine, parce que la manipulation est simplifiée : il est plus rapide de mesurer 1 cm³ que de peser 0,50 gr. D'autre part, la réaction est bien plus régulière si on opère sur des liquides. Nous insisterons sur ce point un peu plus loin.

ALBUMINE

Les matières protidiques qui sont conseillées — tant pour l'essai de la trypsine que pour celui de la pepsine — par les différents codex sont assez variées. Nous en avons étudié quelques-unes :

a) *Fibrine*. — Le codex prescrit pour l'essai protéolytique de la pancréatine, la fibrine de porc desséchée ou assorée. Le produit est délicat à préparer. On le trouve assez difficilement dans le commerce.

L'origine de la fibrine (porc, mouton, etc...) son degré de tamisage, la quantité d'eau qu'elle contient (facteur très important dans le cas de la fibrine essorée) sont autant de facteurs qui ont une telle importance que les résultats ne sont plus comparables que par accident.

b) *Ovalbumine*. — Le blanc d'œuf est indiqué par toutes les pharmacopées pour l'essai de la pepsine, sauf en France et en Suisse. Il est difficile de régler de façon précise l'humidité et le degré de division du réactif. Mais, même en précisant ces conditions du mieux possible, nous avons observé des variations dans les résultats, qui seraient dues, d'après certains auteurs, à la race des poules, l'âge des œufs et la durée de cuisson (?).

c) *Albumine végétale - Edestine*. — En 1938, M. R. CORTESI, dans une thèse sur « *l'Edestine. Son application au titrage de la Pepsine* » (Paris), étudie l'emploi de l'édestine : albumine retirée du *Canabis Sativa*, et décrit minutieusement sa préparation.

Les graines de chènevis concassées sont dégraissées au benzène. Puis, la poudre est traitée par une solution de chlorure de sodium. L'édestine cristallise. On la purifie, et on obtient une poudre cristalline, de couleur crème, inaltérable.

Malheureusement, cette préparation est longue et assez pénible (il faut 1.500 gr. de graines, 16 kg. de benzène,

1.300 gr. de chlorure de sodium, pour obtenir à peine 100 gr. d'édestine). Nous n'avons pas retenu le procédé.

d) *Gélatine*. — Nous n'avons pas retenu davantage la gélatine qui, aux concentrations nécessaires (plus de 5 p. 100), donne un gel incompatible avec les conditions de l'expérience, comme nous le montrerons plus loin.

e) *Peptone*. — Les diverses albumines essayées nous ont montré l'influence de leur état physique sur la régularité de la réaction. Le degré de division, l'humidité de ces poudres organiques sont difficiles à préciser. Aussi, avons-nous pensé à la dissolution et avons-nous cherché un protide soluble dans l'eau. D'autre part, nous avons constaté que, toutes choses égales d'ailleurs, l'activité fermentaire était bien plus régulière lorsque tous les produits en présence étaient en solution. Au début de nos recherches, où nous opérions avec plusieurs grammes de fibrine délayés dans de l'eau distillée, nous étions obligés de tenir compte du rapport volume de poudre - volume d'eau, de la hauteur du liquide, de la fréquence et de la force de l'agitation; et, encore, des phénomènes d'adsorption nous gênaient-ils parfois. L'emploi de trypsine et de peptone liquides ont rendu ces précautions inutiles. Il nous arrive encore d'opérer, pour certains étalonnages, avec la dilution de trypsine dans du lactose. Mais nous n'employons que de très faibles quantités de poudre insoluble (5 mg.) avec au moins 60 cm³ d'eau. Dans ces conditions, les phénomènes d'adsorption incriminés plus haut ne gênent plus.

Nous avons obtenu d'excellents résultats avec une solution de peptone bactériologique de CHAPOTEAUT, préparée de la façon suivante :

Peptone de CHAPOTEAUT	100 gr.
Cyanure de mercure	0,20
Eau distillée	1.000 cm ³ environ

Porter à l'ébullition 5 minutes. Laisser refroidir. Filtrer sur papier, de façon à obtenir un liquide parfaite-

ment clair. Compléter à 1.000 cm³ et conserver à la glacière.

Cette solution semble rester stable et garder la même activité. Nous avons réuni dans un tableau les épreuves que nous avons fait subir à une solution préparée le 31 Octobre 1938.

DATES	ACIDES AMINÉS EN CM ³ DE SOUDE 0,1 N	
	préformés dans 10 cm ³ de la solution de peptone	dûs à 30 cm ³ de la solution de peptone attaqués par 5 mg. de trypsine
31 Octobre 1938	1,58	0,76
7 Novembre —	1,56	0,75
19 — —	1,57	0,76
27 — —	1,60	0,76
15 Décembre —	1,57	0,77
18 Janvier 1939	1,58	0,75
3 Mars —	2,34	1,20

Le 3 Mars, la solution était trouble; sa surface était couverte d'un voile. Elle était restée à la température du laboratoire depuis l'essai précédent.

Nous admettons que 10 cm³ de cette solution correspondent à 1 gr. de peptone, et, par la suite, nous dirons indifféremment : *gramme* ou *centimètre cube* de peptone.

CHAPITRE II

CONDITIONS DE L'ACTIVITÉ DE LA TRYPSINE

La réaction trypsine-peptone, comme tous les phénomènes fermentaires, est soumise à de multiples facteurs de variation.

Nous n'avons pas cherché à les étudier tous, pour en tirer une loi générale. Au contraire, nous nous sommes efforcé de fixer une technique telle qu'elle permit d'en éliminer un certain nombre (temps, température, etc.). Tout ce que nous allons dire doit être entendu « DANS LES CONDITIONS DE L'EXPÉRIENCE », et nous ne saurions trop insister sur l'importance de ce correctif.

Nous décrirons donc :

- 1° la technique employée;
- 2° les observations que cette technique nous a permis de faire;
- 3° le titrage des réactifs.

TECHNIQUE EMPLOYÉE

Principe.

Nous rappelons brièvement le principe :

- a) la trypsine digère la peptone un certain temps, au bain marie;
- b) le résultat de la digestion, refroidi et filtré, est neutralisé;
- c) on ajoute du formol, lui-même neutralisé, qui libère les acides aminés. Ces acides sont dosés, en présence de l'indicateur qui a servi aux neutralisations précédentes, avec de la soude titrée.

Les résultats s'expriment donc en centimètres cubes de soude 0,1 N. Nous n'avons pas cherché à traduire cette quantité de soude en un acide aminé déterminé, ce qui exigerait l'emploi d'un coefficient qui risque de multiplier les erreurs. Nous dirons : « Telle réaction donne 0,70 cm³ d'acides aminés », voulant exprimer par là : « TELLE RÉACTION DONNE 0,70 cm³ DE SOUDE 0,1 N NÉCESSAIRE POUR NEUTRALISER LES ACIDES AMINÉS. »

Remarques.

1) *Temps et température de digestion.* — Le codex dit de laisser le mélange ferment + protide, au bain marie à 50°, durant 6 heures. Ce long temps rend l'opération très pénible.

Nous avons fait varier la température de 40 à 75°, le temps de 10 m. à 8 heures. Il serait fastidieux de décrire ici ces essais. Ils nous ont permis de choisir :

temps = 1 heure

température = 60°

Dans ces conditions (1 heure, 60°), le dosage ne dépasse pas le temps d'une opération de laboratoire courant, et permet cependant l'étude de l'activité fermentaire de la trypsine.

2) *pH.* — Le mélange peptone + trypsine est porté au volume final de 60 cm³ avec de l'eau distillée. Le pH oscille autour de 6; à la fin de la digestion, il est de 5 environ. Nous avons essayé de l'amener à 8, pH optimum de l'activité de la trypsine. Nous sommes obligés d'avouer que nous n'avons pu y parvenir :

SOLUTION TAMPON. — Tout virage est ensuite impossible.

SOUDE. — Essais avec des quantités variant, de 2 cm³ HONa 0,1 N à 5 cm³ HONa N. La soude attaque la peptone; en soude normale, production d'un gel.

CHAUX. — 0,05 à 2 gr. En fin de réaction, le mélange est franchement alcalin à la phtaléine. Mais la chaux, elle aussi, attaque la peptone.

CARBONATE DE CHAUX. — Le gaz carbonique rend le mélange acide à la phtaléine. Après ébullition de 15 m. (ébullition pénible à cause de la mousse qui se forme), la phtaléine rosit, mais le virage reste incertain.

CARBONATE ET SULFATE D'AMMONIAQUE. — Aux difficultés dues à SO_2 ou à CO_2 , s'ajoute le fait que les sels ammoniacaux sont aussi dosés par la méthode au formol, et faussent les résultats.

Nous n'avons pas tenté d'autre essai.

3) *Arrêt de la réaction.* — Au bout d'une heure, refroidir sous un courant d'eau, pour arrêter l'activité du ferment. Filtrer sur papier. La filtration sur filtre simple est facile. On obtient un liquide clair et jaune ambré; rougeâtre, lorsqu'on a ajouté du sang. Faire le dosage dans l'heure qui suit. En effet, l'action de la trypsine est, non arrêtée, mais considérablement ralentie. Si les résultats ne sont pas sensiblement modifiés dans les deux ou trois heures qui suivent, il n'en est plus de même, au bout de 24 heures, surtout si le laboratoire est à une température assez élevée.

4) *Virage.* — Le mélange acide est neutralisé. On ajoute 10 cm³ de formol dilué au demi et neutralisé. Les acides aminés libérés sont dosés par addition de soude titrée.

Dans la méthode classique de SOERENSEN, on emploie comme indicateur la phtaléine du phénol. Malheureusement, le liquide que nous étudions est trop coloré pour que le virage soit visible.

Nous employons :

10 gouttes de phénol phtaléine, sol. alc. à 1/100;

2 gouttes de bleu de bromo-thymol, sol. aq. à 0,20/100
(ajouter à la solution 2 cm³ environ de HONa 0,1 N).

Le liquide acide est jaune franc. L'addition de soude fait apparaître le vert, puis le bleu, enfin le lilas, terme choisi tout d'abord.

Actuellement, nous obtenons des résultats plus précis avec le dosage « par reste » :

- 1° un excès de soude jusqu'au rouge pourpre ;
- 2° de l'acide chlorhydrique goutte à goutte jusqu'au bleu sans reflets roses.

5) *Défécation*. — Ce virage demande un peu d'habitude pour être exactement saisi.

Pour faire des dosages « fins », nous avons essayé de déféquer la solution, c'est-à-dire de la débarrasser de la peptone en excès qui « tamponne » le milieu. Nous n'avons pu y arriver. En effet, aucun défécant classique ne nous a donné de bons résultats (sous acétate de plomb, réactif de TANRET, acide trichloracétique, acide tungstique, acide métaphosphorique, hydrate de zinc, hydrate d'alumine, etc.). Seul l'alcool précipite correctement la peptone. Mais nous nous sommes heurté à des difficultés techniques délicates à résoudre : en effet, il faut 10 volumes d'alcool à 96° pour 1 volume de liquide à déféquer. Puis l'alcool doit être étendu d'une assez grande quantité d'eau, d'abord pour que les acides aminés soient libérés régulièrement, ensuite pour que l'alcoolate de soude formé ne fausse pas les résultats.

Dans ces conditions, si nous voulons partir de 10 cm³ de mélange filtré peptone + trypsine (correspondant, lors du dosage du pouvoir anti-tryptique du sang à 1/6 de cm³ de sang seulement), nous sommes amenés à faire un dosage acidimétrique sur un volume total de près de 500 cm³.

Ces multiples dilutions font perdre au résultat la précision que lui donne un virage plus sensible. Quant à chasser l'alcool par ébullition, ou par distillation sous pression réduite, là encore le progrès obtenu ne vaut pas ces nouvelles manipulations longues et délicates. Par ail-

leurs, un peu d'habitude suffit pour apprécier le virage décrit tout d'abord. Nous conseillons d'examiner à travers le liquide un point brillant (lampe électrique, éclat de soleil). On voit nettement le reflet, tout d'abord pourpre, devenir rose, puis brusquement (à 2/100 de cm³ près) jaune verdâtre.

Technique.

Tous ces points secondaires fixés, il devient aisé de décrire la technique :

1° mettre les quantités de peptone et de trypsine dans un flacon de 150 cm³ bouchant bien. Compléter à 60 cm³ avec de l'eau distillée. Agiter. Mettre au bain marie à 60°, 1 heure, en agitant toutes les 10 m. environ.

2° Refroidir rapidement dans un courant d'eau. Filtrer.

3° Prélever 10 cm³ de filtrat. Ajouter 50 cm³ d'eau distillée, 10 gouttes de phtaléine de phénol et 2 gouttes de bleu de bromo thymol. Ajouter un excès de soude 0,1 N jusqu'au rouge pourpre ; puis ramener au bleu sans reflets roses, avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N ajusté à la soude.

4° Ajouter 10 cm³ de formol dilué au demi et neutralisé en présence du même indicateur. Les acides aminés, libérés en quelques secondes, font virer l'indicateur au jaune.

Verser un excès connu de soude = soient A cm³.

Ramener à la neutralité avec Cl H = soient B cm³.

Nous verrons plus loin que la poudre ou la solution de peptone contient des acides aminés « préformés » (c'est-à-dire qui ne sont pas dus à l'action protéolytique de la trypsine).

Si C cm³ représentent la soude nécessaire pour les neutraliser, nous dirons :

$(A - B) - C =$ acides aminés qui caractérisent l'activité de la trypsine.

ETUDE DE L'ACTION FERMENTAIRE

Dans les conditions d'expérience que nous venons de fixer, nous avons remarqué que deux facteurs principaux intervenaient :

- les quantités relatives de peptone et de trypsine;
- la quantité absolue de trypsine.

1) *Quantités relatives de Peptone et de Trypsine.*

Si on fait augmenter la quantité de peptone, la trypsine restant constante, les acides aminés varient.

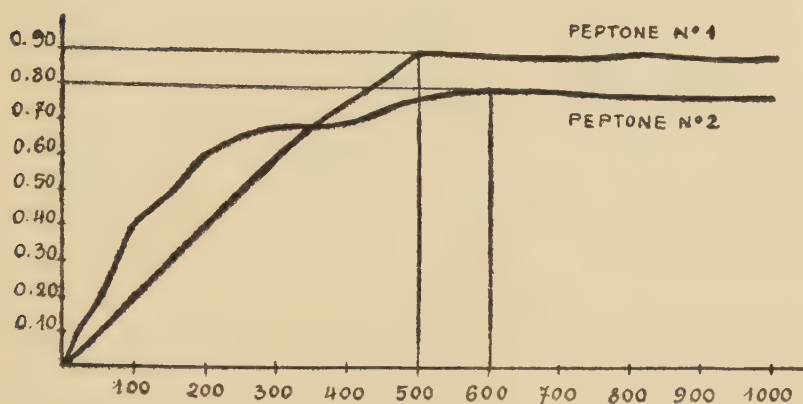
- a) ils augmentent d'abord très vite;
- b) puis l'augmentation se ralentit progressivement;
- c) on arrive enfin à une zone où, la peptone augmentant toujours, les acides aminés restent les mêmes : c'est la « zone neutre ».

Nous réunissons dans le tableau suivant les résultats obtenus avec deux peptones essayées.

Nous avons employé 0,50 gr. de dilution lactosée de trypsine, correspondant à 5 mg. de trypsine pure.

QUANTITÉ DE PEPTONE en Cm3	PROPORTION PEPTONE/ TRYPSINE	ACIDES AMINÉS TROUVÉS	
		Peptone n° 1	Peptone n° 2
5	100 doses	0,21	0,44
10	200 »	0,40	0,59
15	300 »	0,61	0,67
20	400 »	0,74	0,75
25	500 »	0,90	0,75
30	600 »	0,89	0,78
35	700 »	0,89	0,77
40	800 »	0,91	0,79
45	900 »	0,91	0,78
50	1000 »	0,89	0,77

Ces chiffres peuvent être répartis sur une courbe :



On pourrait calculer l'équation de cette courbe qui est peut-être de la forme :

$$y = a x^3 + b x^2 + c x$$

on voit que :

pour la peptone n° 1, la zone neutre débute à 500 doses ;

pour la peptone n° 2, la zone neutre débute à 600 doses.

2) *Quantité absolue de Trypsine.*

Lorsque le rapport peptone-trypsine est tel qu'on se trouve au-delà de la limite, c'est-à-dire en zone neutre, et à ce moment-là seulement, la quantité d'acides aminés formés est proportionnelle à la quantité de trypsine en jeu.

La réaction est de la forme :

$$y = a x$$

et la courbe qui la représente est une droite.

Donc, lorsque la proportion peptone-trypsine est assez forte, les acides aminés dosés caractérisent directement la trypsine.

TITRAGE DES RÉACTIFS

Dans un chapitre précédent, nous avons décrit la forme des réactifs employés. Nous pouvons maintenant les titrer.

Nous prendrons un exemple concret : une trypsine dont nous avons préparé :

a) une dilution au centième dans du lactose;

b) une solution dans l'eau distillée (voir page 18);

une peptone bactériologique de CHAPOTEAUT dont nous avons préparé une solution à 10 p. 100 (voir page 20).

a) *Titration de la Peptone.*

Nous faisons réagir, dans 6 flacons de 150 cm³, 5 mg. de trypsine (0,50 gr. de dilution lactosée) et, dans le 1^{er} flacon, 10 cm³; dans le 2^e, 20 cm³; ...dans le 6^e, 60 cm³ de solution de peptone.

Les quantités d'acides aminés trouvées (0,40 cm³; 0,70 cm³; etc.) permettent de construire la courbe et montrent :
que la zone neutre commence à 700 doses;

qu'en zone neutre, 5 mg. de trypsine libèrent 0,90 cm³ d'acides aminés.

b) *Acides aminés préformés.*

La solution de peptone contient des acides aminés préformés qu'il faut doser : 10 cm³ de solution, traités comme d'habitude, 1 h. à 60°, mais sans trypsine, donnent 1,58 cm³ de soude.

c) *Titration de la solution de Trypsine.*

Soit 1 cm³ de la solution de trypsine (ou tout autre quantité, correspondant à 5 mg. ou moins de ferment actif; un essai préalable permet d'être fixé). Nous le faisons réagir sur 40 cm³ de peptone (nous savons que la zone neutre commence à 700 doses, soient 35 cm³ de peptone pour 5 mg. de trypsine. Nous employons 40 cm³, pour être sûr

de rester dans les conditions requises, le dosage nous donne :

8 cm³ de HONa 0,1 N

1,15 cm³ de ClH 0,1 N

8 - 1,15 = 6,85 = acides aminés totaux.

1,58 × 4 = 6,32 = acides aminés préformés dans 40 cm³ de peptone.

6,85 — 6,32 = 0,53 = acides aminés dus à la trypsine.

Donc, nous savons maintenant que 1 cm³ de solution de trypsine, mis en présence de 35 cm³ de peptone (ou plus), libère 0,53 cm³ d'acides aminés.

d) *Calcul du coefficient K.*

Nous savons qu'en zone neutre, l'équation représentant la réaction est de la forme :

$$y = K x$$

soit :

$$\text{trypsine (en mg.)} = K x \text{ soude (en cm}^3\text{)}$$

dans notre expérience nous avons trouvé :

$$5 \text{ mg.} = K x 0,90$$

d'où nous tirons

$$K = \frac{5}{90} = 0,055$$

Dans l'essai de la solution de trypsine, nous avons trouvé 0,53 cm³ d'acides aminés. En appliquant l'équation $y = K x$, nous en déduisons :

$$x \text{ trypsine} = 0,055 \times 0,53 = 2,91$$

1 cm³ de solution contient 2,91 mg. de trypsine active. Ce coefficient n'intéresse pas directement l'étude du pouvoir antitryptique du sang. Mais il permet de calculer la quantité de trypsine active contenue dans une solution ou toute autre préparation. Peut-être même, permettrait-il de titrer la trypsine et les préparations à action protéolytique (pancréatine), en comparant leur activité à celle d'une trypsine étalon, ou même d'une trypsine théorique.

Nous savons que la dilution lactosée conserve son activité; c'est elle qui nous sert d'étalon.

La peptone en poudre est titrée lors de la première solution. Théoriquement, chaque nouvelle solution devrait-être à nouveau étudiée. L'expérience nous a appris que, pratiquement, une même peptone, conservée à l'abri de l'humidité et de la chaleur, donnait des solutions à peu près identiques.

Enfin, la solution de trypsine est automatiquement étudiée à chaque mesure du pouvoir antitryptique. On voit son titre rester constant pendant un mois environ, puis baisser de jour en jour. On prépare alors une nouvelle solution.

CHAPITRE III

ETUDE DU POUVOIR ANTITRYPTIQUE DU SANG

Au début de ce travail, nous avons dit que le sang avait la propriété d'enrayer l'action protéolytique de la trypsine : ce pouvoir appelé « pouvoir antitryptique » a été signalé par de nombreux auteurs (WRIGHT, OPIE, etc.). Nous remarquons, d'autre part, que sa mesure était incertaine, surtout à cause de l'imprécision des réactifs employés. Nous avons décrit une méthode de titrage des produits que nous proposons d'utiliser. Nous allons maintenant décrire la technique de mesure du pouvoir antitryptique, et, ensuite, les observations cliniques ou pathologiques que nous avons faites.

MESURE DU POUVOIR ANTITRYPTIQUE

Principe.

Puisque nous pouvons mesurer exactement l'activité d'une prise d'essai de trypsine, il nous sera facile d'en mesurer les variations provoquées par une influence quelconque. Il suffira d'effectuer deux opérations parallèles : l'une, ne contiendra que la trypsine ; l'autre, contiendra à la fois cette trypsine et le composé dont nous voulons étudier l'action.

Dans le cas qui nous occupe, la deuxième expérience contiendra la trypsine et le sang.

Remarques.

Nos expériences nous ont montré qu'à côté du dosage du pouvoir antitryptique dont nous venons d'exposer le principe, toute une série de conditions secondaires sont à considérer, que nous allons décrire tout d'abord, et qui sont nécessaires à la compréhension de la technique.

a) Forme de la trypsine. — La trypsine en poudre, mise au contact du sang, donne des résultats irréguliers. Nous n'employons qu'une solution de trypsine préparée, comme nous l'avons indiqué page 18.

Nous avons remarqué que, quelquefois, la trypsine laissée à 38° pendant 3/4 d'heure, avait ensuite, vis-à-vis de la peptone, une activité augmentée. Le phénomène est surtout sensible avec une solution vieillie, qui semble « s'endormir »; aussi, la prise d'essai qui servira de témoin devra être traitée de la même façon que le couple sang-trypsine.

b) Temps de contact et température. — Le sang neutralise l'activité de la trypsine, mais l'intensité de ce phénomène varie en fonction de la température et de la durée du contact des deux éléments.

Dans un premier temps, nous mélangeons dans un tube à essai la solution de trypsine et le sang.

Lorsque ce contact a été jugé suffisant, dans un deuxième temps, nous procédons à la mesure de l'activité de la trypsine, selon une technique que nous décrirons plus loin.

1° TEMPS DE CONTACT A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE. — Nous avons constaté qu'au début, le sang masque très vite l'action de la trypsine (de quelques secondes à 5 minutes). Puis le pouvoir antitryptique reste à peu près constant pendant 2 h. 30. Il diminue ensuite progressive-

ment. Nous avons résumé nos observations dans le tableau suivant :

TEMPS DE CONTACT SANG + TRYPSINE dans un tube à essai	ACIDES AMINÉS CARACTÉRISANT LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE		
	Sang n° 1	Sang n° 2	Sang n° 3
5 m.		0,08	0
10 »		0,06	
15 »		0,13	
35 »			0,72
45 »		0,11	
1 h. 05			0,74
1 » 15	0,68		
1 » 45		0,12	0,71
2 » 35	0,68		
3 » 05			0,60
5 » 05			0,49
5 » 35	0,45		
6 » 05	0,49		0,31
6 » 35	0,43		

2° TEMPS DE CONTACT A 38°. — La température de contact a une grande importance. Après de multiples tâtonnements, nous nous sommes arrêté à 38° au bain-marie. Cette température nous a donné les meilleurs résultats et, à la rigueur, l'étuve du laboratoire peut remplacer le bain-marie.

TEMPS DE CONTACT SANG + TRYPSINE à 38°	ACIDES AMINÉS CARACTÉRISANT LE POUVOIR ANTITRYPTIQUE		
	Sang n° 4	Sang n° 5	Sang n° 6
15 m.		0,05	
30 »	0,01	0,07	0,11
35 »	0		
40 »	0,24		0,22
45 »	0,23	0,75	
50 »	0,13		0,09
55 »	0,08		
1 h.			0
1 » 10			0,04
1 » 15		0,18	
1 » 30		0	

On voit nettement que l'expérience passe par un maximum aux environs de 40 minutes, pour décroître ensuite plus ou moins vite.

3° TEMPÉRATURE DE LA PEPTONE. — La solution de peptone doit-être conservée à la glacière. Nous avons constaté quelquefois des irrégularités dues, croyons-nous, à l'écart souvent considérable entre la température de la peptone et celle de la trypsine, au moment du contact. Nous réchauffons donc, au préalable, la peptone, à 38°.

Technique.

Il est facile, maintenant, de décrire la technique complète d'une mesure. Nous opérons sur du sang citraté à 10 %. Nous supposons que la peptone et la trypsine sont celles qui nous ont servi d'exemple pour le titrage des réactifs.

1° Dans deux tubes à essai, mettre :

a) 1 cm³ de solution de trypsine (voir préparation page 18);

b) 1 cm³ de solution de trypsine + 1 cm³ de sang.

Mettre au bain-marie pendant 45 m., à 38°. En même temps, mettre au bain-marie 2 flacons de 150 cm³, contenant chacun : 40 cm³ de peptone (préparation page 20).

2° Dans les deux flacons de 150 cm³, ajouter :

a) le contenu du tube n° 1 + 20 cm³ d'eau;

b) le contenu du tube n° 2 + 20 cm³ d'eau.

Boucher, agiter. Plonger dans un bain-marie à 60°, pendant 1 heure, en agitant toutes les 10 minutes. Refroidir rapidement dans l'eau.

3° Filtrer.

4° 10 cm³ de filtrat clair;

50 cm³ d'eau distillée;

15 gouttes de phénol-phtaléine;

2 gouttes de bleu de bromo-thymol;

+ un excès de soude 0,1 N jusqu'au rouge pourpre;
de l'acide chlorhydrique 0,1 N jusqu'au bleu sans reflets rouges.

5° 10 cm³ de formol dilué au demi et neutralisé;
le mélange devient jaune.

Un excès connu de HONa 0,1 N jusqu'au
pourpre — a cm³
de l'acide chlorhydrique 0,1 N jusqu'au
bleu — b cm³

6° Calculs.

L'essai I a donné : HONa — a cm³
ClH — b cm³

L'essai II a donné : HONa — a'
ClH — b'

Nous savons que les 40 cm³ de peptone contiennent
n cm³ d'acides aminés préformés. Nous dirons :

Essai I : $a - b = m$ $m - n = x$

Essai II : $a' - b' = m'$ $m' - n = x'$

$$x - x' = p$$

Plus rapidement, et toutes simplifications faites nous
disons :

$$b' - b = p$$

Cette quantité de soude p correspond aux acides aminés
qui, dans le second essai, n'ont pas été libérés parce qu'une
partie de l'activité de la trypsine a été neutralisée par le
sang.

Interprétation.

Nous avons pensé, tout d'abord, à traduire la soude
trouvée en trypsine, grâce au coefficient K, et à dire, par
exemple: 1 cm³ de sang neutralise 1,87 mg de trypsine.

Mais on peut considérer une trypsine sous deux angles
différents:

1° En envisageant son *poids*: l'unité sera le milligramme;
et un même poids de différentes trypsines libérera des
quantités différentes d'acides aminés.

2° En envisageant son *activité protéolytique*: l'unité
sera par exemple 1 cm³ d'acides aminés libérés. Dans ce

cas, pour libérer 1 cm³ d'acides aminés, il faudra des poids différents de trypsines différentes.

Or, le sang neutralise, non pas un certain *poids*, mais une certaine *activité* de trypsine, neutralisation qui se traduit d'ailleurs en centimètres cubes de soude. Comme la trypsine-réactif a été titrée quant à son activité, un même sang étudié avec deux trypsines, même très différentes, donne le même chiffre de pouvoir antitryptique; à la condition de l'exprimer en soude: c'est-à-dire en activité protéolytique.

Au contraire, si on veut l'exprimer en poids de trypsine, les deux expériences faites avec le même sang donneront des chiffres différents, puisque le coefficient K changera pour chaque trypsine. Donc, dans notre expérience, nous dirons, puisque p cm³ correspondent à 1 cm³ de sang :

$$\text{Pouvoir antitryptique (pour 100 cm}^3 \text{ de sang)} = p \times 100$$

Exemple.

Les 40 cm³ de peptone contiennent 6,32 cm³ d'acides aminés préformés.

$$\begin{aligned} \text{Essai I. — HONa} &= 9 \text{ cm}^3 \\ \text{Cl H} &= 1,69 \text{ cm}^3 \\ 9 - 1,69 &= 7,31 \\ 7,31 - 6,32 &= 0,99 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Essai II. — HONa} &= 9 \text{ cm}^3 \\ \text{Cl H} &= 1,99 \text{ cm}^3 \\ 9 - 1,99 &= 7,01 \\ 7,01 - 6,32 &= 0,69 \\ 0,99 - 0,69 &= 0,34 \\ 0,34 \times 100 &= 34 \end{aligned}$$

Le pouvoir antitryptique du sang étudié est de 34.

L'essai I donne $0,99 \times 0,055 = 5$ mg. 44 de trypsine. Cela permet de se rendre compte de la bonne marche de la réaction (prise d'essai théorique 5 mg.) et qu'on a bien opéré en zone neutre, ce qui est essentiel.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

Nous avons fait 150 mesures de pouvoir antitryptique et en avons retiré un certain nombre de conclusions.

POUVOIR ANTITRYPTIQUE DES SUJETS NORMAUX

Valeur

Le pouvoir antitryptique d'un sujet normal oscille autour de 25 (limites extrêmes 20-30).

Etat du Sang.

Nos dosages ont presque tous été faits en même temps que des mesures de pouvoir hémobactéricide et d'activité peroxydasique. Aussi, opérons-nous sur du sang complet, citraté à 10 p. 100. Le sérum et le plasma donnent d'ailleurs des résultats identiques (en tenant compte de la dilution due au citrate de soude).

Nos sujets sont à jeun (sang prélevé à 11 h., après un petit déjeuner matinal à 6 h.). La digestion semble augmenter le pouvoir antitryptique, bien que de façon assez irrégulière.

Sang conservé.

Le pouvoir antitryptique du sang conservé semble intéressant. Au bout de 24 h., l'activité anti-fermentaire a déjà sensiblement diminué. Au bout d'une dizaine de jours, elle devient pratiquement nulle.

Il semble que la conservation (du point de vue antitryptique) soit meilleure à la température du laboratoire qu'à la glacière. Nous parlerons plus loin de l'action des sulfamides sur la conservation du pouvoir antitryptique.

Enfin, il semble que, si le sang et le sérum ont la même activité, au début, le sérum conserve plus longtemps son pouvoir. Toutes ces notions ne doivent être acceptées qu'avec réserve. En effet, nos observations sont trop peu nombreuses pour apporter une certitude.

Nous avons suivi 5 sangs pendant une quinzaine de jours, tant à la glacière qu'à la température ordinaire. Pour 3 autres sangs, nous avons comparé le sang total et le plasma. Le premier n'a rien donné (baisse parallèle). Le second a gardé son pouvoir antitryptique plus longtemps. Le troisième, souillé, s'est mal conservé. Nous avons engagé de nouvelles recherches qui ne sont pas encore terminées.

Sang de lapin.

Le pouvoir antitryptique du sang de lapin est le même que celui de l'homme, il varie donc entre 20 et 30.

Sulfamides - Diazoïques.

L'administration de sulfamides à un sujet (donneur) augmente souvent son pouvoir antitryptique. Cette augmentation, qui s'accompagne en général d'une amélioration du pouvoir hémobactéricide, permet d'augurer favorablement des qualités immunisantes du sang du donneur.

Nous avons remarqué avec étonnement qu'un sang de sujet « sulfamidé » conserve « in-vitro » un pouvoir antitryptique élevé, beaucoup plus longtemps que la normale (6 observations). Qui plus est, du sang ordinaire, additionné « in-vitro » de Rubiazol, voit souvent son pouvoir antitryptique stabilisé (2 observations) et même augmenté (2 observations).

Par contre, chez le lapin, nous n'avons encore pu obtenir d'augmentation nette du pouvoir antitryptique, après injection de sulfamide. D'ailleurs, MAYER, HALPHAN, etc., signalent que le lapin réagit très mal aux sulfamides. De leur côté, SEDALLION et M^{lle} CLAVEL ont montré qu'avant de répondre aux injections d'antigène, le lapin présente un « temps perdu », une certaine « latence ».

Les phases « négatives » ou « inertes » que présente le lapin en face des injections ou ingestions de corps organo-soufrés, forment un problème particulier; et il est intéressant de noter que des méthodes d'investigation, basées sur des disciplines différentes, aboutissent sensiblement au même résultat.

Vaccination.

MM. JEANNENEY et CASTANET ont été amenés à injecter à des sujets normaux des anatoxines de RAMON. Nous avons observé qu'une vaccination faite à doses correctes déclanche d'ordinaire chez l'homme une augmentation du pouvoir antitryptique et du pouvoir hémobactéricide.

Par contre, nous avons toujours observé, chez le lapin, une chute du pouvoir antitryptique et du pouvoir hémobactéricide, après chaque injection de vaccin, et cela quelle que soit la dose. Cette « phase négative » que WRIGHT avait signalée comme se produisant aussi chez l'homme, mais de manière éphémère, au cours des injections de vaccins, semble, chez le lapin, durer plusieurs jours. Néanmoins, les qualités défensives apparaissent dans le sang de cet animal, et elles se traduisent par des phénomènes d'agglutination plus ou moins marqués. Aussi, l'appellerons-nous « phase de latence », principalement à la suite des travaux de RAMON qui montrent que la production d'unités antitoxiques commence aussitôt après l'injection d'antigène, mais avec une rapidité plus ou moins grande.

Il existe chez l'homme des variations individuelles dans cette phase de latence. On peut même observer des su-

jets dont la phase négative est si importante et si durable, après vaccination, qu'il ne saurait être question de les utiliser comme « donneurs pour les immuno-transfusions ».

Le pouvoir antitryptique permet d'apprécier cette phase de latence, donc de sélectionner les donneurs, en vue de la cataphylacto-transfusion, en rejetant les individus lents à produire des anticorps.

POUVOIR ANTITRYPTIQUE

AU COURS DES INFECTIONS

WRIGHT, le premier, étudia parallèlement le pouvoir antitryptique et la réserve alcaline. Il montra que, lorsque « dans les infections expérimentales », le pouvoir antitryptique s'élève, tandis que la réserve alcaline ne varie pas, il est de règle que l'animal continue à vivre. Il en est de même quand le pouvoir antitryptique et la réserve alcaline ne varient ni l'un ni l'autre.

Par contre, quand le pouvoir antitryptique s'abaisse, alors que la réserve alcaline reste constante, il y a de grandes chances pour que l'animal succombe.

Enfin, quand le pouvoir antitryptique s'abaisse en même temps que la réserve alcaline, celle-ci évoluant vers l'acidose, il est de règle que l'animal succombe.

Ces constatations ayant été faites sur l'animal et sur les blessés de guerre, présentent, au point de vue pronostique, un intérêt indéniable.

D'autres travaux du biologiste anglais ont montré que, dans certains cas, le leucocyte infecté par le bacille de KOCH, non seulement perdait tout pouvoir antitryptique, mais devenait même capable de digérer les albumines organiques. Ainsi, non seulement par la perte de son pouvoir antitryptique, le leucocyte devient un agent neutre, mais encore le pouvoir antitryptique étant inversé, le leu-

cocyte devient même un agent nocif, véritable vecteur actif de l'infection.

Depuis la guerre, les recherches de WRIGHT n'avaient eu que peu d'écho parmi les cliniciens et les biologistes. Aussi, nulle publication ou presque ne vit le jour sur ces questions.

Néanmoins, en 1936, dans un travail sur l'immuno-transfusion, MM. JEANNENEY et CATANET ont signalé tout l'intérêt que présentait l'étude du pouvoir antitryptique du sang chez les grands infectés.

Reprenant ces idées, nous avons constaté, en comparant pouvoir antitryptique et pouvoir hémobactéricide, que :

Tout infecté qui *se défend bien* présente un bon pouvoir antitryptique. Lorsque pouvoir antitryptique et pouvoir hémobactéricide s'élèvent ensemble, le pronostic est favorable.

Tout infecté qui *se défend mal* a un pouvoir antitryptique médiocre dès le début.

Ces caractéristiques s'exagèrent en quelque sorte au cours du frisson : Après certains frissons, en effet, on voit survenir une phase défensive « positive », au cours de laquelle le pouvoir hémobactéricide et le pouvoir antitryptique s'élèvent considérablement : le pronostic est alors favorable. Au contraire, après certains frissons, survient une phase « négative ». On voit alors s'effondrer, à la fois, le pouvoir antitryptique et le pouvoir hémobactéricide.

Il y a une différence entre la « phase de latence » de RAMON, dont nous avons parlé plus haut, où l'organisme fabrique — mais en petite quantité — des anticorps, donc, commence à se défendre; et cette phase négative, où nous assistons à une inhibition presque totale des défenses de l'organisme.

Nous avouons cependant que, malgré les constatations de WRIGHT, nous n'avons jamais trouvé de pouvoir anti-

tryptique « inversé », c'est-à-dire que jamais le sang étudié n'a eu d'action protéolytique propre.

NATURE DU POUVOIR ANTITRYPTIQUE

La nature du pouvoir antitryptique est rien moins qu'élucidée. Certains y voient un *ferment* leucocytaire; d'autres une *sécrétion* du globule blanc; enfin, ce serait pour beaucoup un moyen de défense auquel participeraient tous les éléments du sang. Nous nous garderons bien de nous prononcer, nous contentant d'apporter au débat la constatation que nous avons faite : le « principe antitryptique » neutralise la trypsine, très irrégulièrement au début. Suivant les sangs, il a fallu de quelques secondes à 45 minutes, pour arriver — toujours progressivement — à un maximum qui se maintient en plateau plus ou moins longtemps; puis le pouvoir antitryptique disparaît — toujours progressivement —. Nous insistons sur ce fait : la trypsine n'est pas *détruite*, mais *masquée*, et si l'on abandonne l'expérience à un temps quelconque, la trypsine reprend tôt ou tard son activité protéolytique totale.

Du point de vue finaliste, si l'on admet les théories qui présentent l'anticorps comme un édifice complexe protido-lipido-glucidique, ne peut-on imaginer que le pouvoir antitryptique représente le moyen de protection de la partie protidique de l'anticorps, comme ses parties lipidique et glucidique seraient protégées par des pouvoirs anti-lipasique et anti-amylasique, non encore étudiés.

CONCLUSIONS

Devant la variété, l'imprécision et les contradictions des méthodes qui mesurent le pouvoir antitryptique du sang, nous avons essayé de mettre au point une technique nouvelle.

Nous avons choisi des réactifs : solution de trypsine et solution de peptone bactériologique de CHAPOTEAUT.

Nous avons décrit un procédé de titrage de ces réactifs, permettant de corriger les écarts dus à la complexité de leur composition.

Enfin, grâce à ces réactifs, nous avons établi une méthode de mesure du pouvoir antitryptique, relativement simple et rapide, c'est-à-dire clinique, qui n'emploie que peu de sang et qui permet des examens en série.

Dans une seconde partie, nous donnons les résultats que nous avons trouvés avec :

des sujets normaux ;

des sujets normaux :

a) après administration de sulfamides ;

b) vaccinés ;

des sangs conservés ;

des septicémies (en relation avec le pouvoir hémobactéricide).

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes Condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes Confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.

VU :
Le Doyen,

Pierre MAURIAC

VU, BON A IMPRIMER,
Le Président,

G. JEANNENEY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER,
Bordeaux, le 3 Juillet 1939
Le Recteur de l'Académie,
G. BOUSSAGOL

BIBLIOGRAPHIE

- AIZAWA (Y). — Studies experimental scurvy; on antitrypsin content in serum of guinea pigs fed on Vitamin C free diet. (Sci. I. Kai M. J. [*Abstr. Sect.*] 54 : 3 June 1935).
- BAYLISS. — *Archives des sciences biologiques*, 261, 1904.
- BENETATO (G.), OPRISIU (C) et CIURDARIU (P). — L'action de la trypsine et du sérum antitrypsique sur la polypeptidémie chez le lapin. (C. R. *Sté de Biologie* 126 : 1039-1041, 1937).
- BURDON (K. L.) et LAFFERTY (C.). — Rapid procedure for quantitative estimation of antitrypsin (*Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 34 : 787-790 June 1936).
- CORTASI (R.). — *Thèse de doctorat en pharmacie*, Paris, 1938.
- FLEXNER (L. B.), BERKSAN (J.), WINTERS (H.) et WOLMAN (I). — Antitryptic titre in pregnancy and in hyperthyroidism. (*Proc. Sté Exper. Biol. & Med.*, 26 : 592-595, Avril 1929).
- GAGARIN (E. D.). — Fluctuation of contents of catalase and anti-catalase in man in physiologic and pathologic conditions. (*J. exper. Biol. & Med.*, n° 33, 12 : 329-333, 1929).
- GENTILE (F.). — Ricerche sullz avitaminosi; il potere anitriptico del siero di sangue nelle avitaminosi sperimentali (*Arch. di fisiol.*, 25 : 33-42 Janv.-Mars 1927, and *Boll. Soc. Ital. di Biol. Sper.* I : 767-773, Nov.-Déc. 1926).
- GOLLA (F. L.), OXON (M. B.). — M. R. C. P. Lond, *The Lancet*, I, 969, 1909.
- HOWARD (J. W.). — Fermentos y antifermentos organicos normales y modificados. Desequilibrio en los estados patologicos. (*Rev. Soc. Argent. de Biol.*, 5 : 713-721, 1929).
- JEANNENEY (G.). — Idées directives de la vaccinothérapie (*Sud-Médical*, Mai 1926).
- Idées directrices de la vaccinothérapie (*Marseille Méd.*, Mai 1926; *Vaccinothérapie en médecine et en chirurgie*, 1 vol., Paris 1928).

JEANNENEY et CASTANET. — Les bases de l'immuno-transfusion (*Gaz. des Hôp.*, 9, 11 Avril 1936, n^{os} 29-30).

Technique de l'immuno-transfusion (*Gaz. des Hôp.*, n^o 55, 9 Juillet 1938).

JEANNENEY, CASTANET et CATOR. — Sur une méthode simplifiée de mesure du pouvoir hémobactéricide (*Acad. de Méd.*, Avril 1938).

Nouvelle méthode de mesure du pouvoir hémobactéricide; ses applications pratiques (*Presse Méd.*, n^o 70, 21 Août 1938).

Le pouvoir hémobactéricide, test de la réponse phylactique des donneurs en vue de l'immuno-transfusion (*Bull. de l'Acad. de Méd.*, 28 Juin 1938, t. CXIX, n^o 25, p. 757).

Augmentation du pouvoir hémobactéricide sous l'influence des corps azoïques (*C. R. Soc. de Biol. de Bordeaux*, 6 Avril 1938, t. CXXVIII, p. 665, 1938).

Le pouvoir hémobactéricide, test de la transmission au receveur des réactions de défense provoquées chez le donneur dans la cataphylacto-transfusion simple et chimique (*Bull. de l'Acad. de Méd.*, 28 Juin 1938, t. CXIX, n^o 25, p. 757).

Transmissibilité par transfusion au receveur de l'augmentation du pouvoir hémobactéricide acquise chez un donneur par l'absorption de corps azoïques (*C. R. Soc. de Biol. de Bordeaux*, 6 Avril 1938, t. CXXVIII, p. 669).

De la valeur pronostique du P. H. B. et des indications thérapeutiques que l'on peut en tirer (*Revue d'Immunologie*, Septembre 1938, n^o 5).

Etude du P. H. B. en chirurgie (*Gaz. Méd. de France*, 1^{er} Octobre 1938, n^o 15, T. XLV).

Mesure du P. H. B. (*Gaz. Hebd. des Sciences Méd. de Bordeaux*, 1938).

LAMBLING. — 239, 1911.

MELKA (J.). — Über die antitryptische Wirkung der Bluteiweissstoffe (*Biol. generalis*, 12 : 217-233, 1936).

MELODIA (G.) et GAFA (P.). — Comportamento del potere antotriptico del siero di sangue dei bambini tuberculotoci e sani durante lo choc da tubercolina (*Lotta contro la tub.*, 5 : 517-522 May 1934).

MONTANARI (M.) et REGGIANI. — Il potere anti-peptico ed il tempo di coagulazione del sangue nelle ustioni, Ricerche sperimentali (*Pathologica*, 23 : 750-754, 15 Déc. 1931).

MULLER et JOCHMANN. — *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1906.

OPIE. — *The Journal of experimental medicine*, 7, 818, 1905.

SEDAILLON, JOURDAN et M^{lle} CLAVEL. — Comment étudier physiologiquement la formation des antitoxines (*Revue d'Immunologie* : Mai 1938, n° 3; Juillet 1938, n° 4; Novembre 1938, n° 6; Janvier 1939, n° 1; Mars 1939, n° 2; Mai 1939, n° 3).

SHONO (N.). — Etude chimique dans les infections sanguines expérimentales par les pyogènes; azote résiduel et pouvoir antitryptique du sérum (*Le Sang*, n° 3, 1934).

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
HISTORIQUE DES MÉTHODES	13
MÉTHODE PROPOSÉE	15
CHAPITRE PREMIER. — Etude des réactifs employés	17
Trypsine	17
Albumine	19
a) <i>Fibrine</i>	19
b) <i>Ovalbumine</i>	19
c) <i>Edestine</i>	19
d) <i>Gélatine</i>	20
e) <i>Peptone</i>	20
CHAPITRE II. — Conditions de l'activité de la trypsine	23
Technique employée	23
<i>Principe</i>	23
<i>Remarques</i>	24
<i>Technique</i>	27
Etude de l'action fermentaire	28
1. <i>Quantités relatives de peptone et de trypsine</i>	28
2. <i>Quantité absolue de trypsine</i>	29
Titrage des réactifs	30
a) <i>Titrage de la peptone</i>	30
b) <i>Acides aminés préformés</i>	30
c) <i>Titrage de la solution de trypsine</i>	30
d) <i>Calcul du coefficient K</i>	31
CHAPITRE III. — Etude du pouvoir antitryptique du sang ..	33
Mesure du pouvoir antitryptique	33
<i>Principe</i>	33
<i>Remarques</i>	34
<i>Technique</i>	36
<i>Interprétation</i>	37
<i>Exemple</i>	38

CHAPITRE IV. — Résultats	39
Pouvoir antitryptique des sujets normaux	39
<i>Valeur</i>	39
<i>Etat du sang</i>	39
<i>Sang conservé</i>	39
<i>Sang de lapin</i>	40
<i>Sulfamides - Diazoïques</i>	40
<i>Vaccination</i>	41
Pouvoir antitryptique au cours des infections	42
Nature du pouvoir antitryptique	44
CONCLUSIONS	45
BIBLIOGRAPHIE	47
